

분지 올리고당이 장내 주요 세균의 생육에 미치는 영향

박종현* · 유진영 · 신옥호¹ · 신현경¹ · 이성준² · 박관화²

한국식품개발연구원 생물공학연구소, ¹한림대학교 식품영양학과

²서울대학교 식품공학과 및 농업생물 신소재 연구센터

Growth Effect of Branched Oligosaccharides on Principal Intestinal Bacteria

Park, Jong-Hyun*, Jin-Young Yoo, Ok-Ho Shin¹, Hyun-Kyung Shin¹,
Sung-Joon Lee² and Kwan-Hwa Park²

Biotechnology Laboratory, Korea Food Research Institute,
Baekhuan-Dong, Bundang-Ku, Sungnam 462-420, Korea

¹Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chunchon 200-702, Korea

²Department of Food Science and Technology, and Research Center for
New Bio-Materials in Agriculture, Seoul National University, Suwon 441-744, Korea

Abstract — To investigate the growth effect of branched oligosaccharides on the principal intestinal microorganisms, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* and *Bacteroides* were cultivated on a medium containing branched oligosaccharides and panose. *B. adolescentis*, *B. logum* and *L. acidophilus* grew effectively on the medium containing panose, while *C. perfringens*, *C. paraputrificum*, *Bac. fragilis* and *S. aureus* did not. The content of panose decreased greatly in the culture broth of branched oligosaccharides of *B. adolescentis*, but it remained in the culture of *C. perfringens*. The results indicated that panose was consumed effectively by *B. adolescentis*, but not utilized by *C. perfringens*. *B. adolescentis* still grew on the panose remained in the broth of mixed cultivation of *B. adolescentis* and *C. perfringens*. Therefore, panose and branched oligosaccharides seem to promote selectively the growth of *B. adolescentis* in the human intestine.

인체의 장내에는 많은 미생물이 상호 공생 또는 길항관계를 유지하면서 섭취된 음식물과 소화관으로부터 분리되는 생체 성분을 이용하여 증식하고 배설되고 있다. 이러한 장내 미생물 군총은 사람의 나이와 식이 등에 따라 크게 영향을 받고 있는데 장년기 및 노년기로 진행되면서 *Bifidobacterium* 등은 급격히 감소하고, *Clostridium perfringens*, *C. paraputrificum* 등은 증가하는데 이는 소화 흡수, 장운동, 면역능의 저하 등에 의해 촉진된다. 또한 채식주의자는 *B. adolescentis*, *Eubacterium aerofaciens* 및 *Eub. contortum*의 군수가 많고 *C. paraputrificum*, *Bacteroides*

fragilis, *Veillonella paruvula*의 군수가 현저히 증가하나 고지방, 육식 등을 많이 섭취하는 경우는 그 반대의 군총 변화가 일어나고 있는 것으로 보고되고 있다(1).

*Bifidobacterium*은 장내에서 lactic acid와 acetic acid를 분비하여 병원성 및 부패성 세균의 증식을 억제하고 항암성, 혈압강하 등에 기여하는 것으로 알려져 있다(2). 한편 여러가지 독소를 분비하는 *C. perfringens*(3), *C. paraputrificum*(4), 병원성 *E. coli*, *Staphylococcus aureus*(5) 등은 ammonia, H₂S, amine, phenol, indole 등의 부패산물과 2차 담즙산, toxin, 발암물질 생산을 유발시키는 균들이다. 따라서 이와 같이 장내세균은 인체의 질병과 밀접한 관계가 있기 때문에 건강의 증진 및 유지를 위해서는 적절한 식

Key words: Panose, branched oligosaccharides, *Bifidobacterium adolescentis*

*Corresponding author

이의 조절로 유용한 균이 우세하고 유해균을 낮게 유도할 필요가 있다.

N-acetylglucosamine, peptide, pantetheine 등(6) 외에 최근에 난소화성 올리고 당인 lactulose(7), raffinose(8), fructo-oligosaccharide(9), galacto-oligosaccharide(10) 등이 *Bifidobacterium*의 증식인자로서 보고되었고 일부는 상품화되어 시판되고 있는 실정이다.

따라서 본 연구는 panose(O- α -D-glucopyranosyl-(1-6)-O- α -D-glucopyranosyl-(1-4)-D-glucopyranose) 및 *Bacillus licheniformis* amylase를 이용하여 쌀로부터 제조한 분지올리고당 혼합물의 *Bifidobacterium* 및 장내 주요 유해 세균에 대한 증식 및 억제효과에 대한 연구를 수행하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균주

본 연구에 사용된 균주는 대표적인 장내 유익균으로 *Bifidobacterium adolescentis* KCTC 3216, *Bifidobacterium logum* IV-27, *Lactobacillus acidophilus* KCTC 3151를 택하였고, 병원성 및 유해세균으로 알려진 *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Clostridium paraputrificum* ATCC 25780, *Clostridium butyricum* ATCC 19398, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Staphylococcus aureus* ATCC 12600와 *Enterococcus faecalis* ATCC 19433을 선정하였다. 또한 장내 최다 우세균들인 *Bacteroides fragilis* ATCC 25285와 *Eubacterium limosum* ATCC 12600도 사용균주로 선택하였다.

배지 및 시약

본 장내 미생물의 계대배양은 EG 사면배지(Eiken, Tokyo)에서 약 3개월마다 계대하였고 사용하기 바로 전에 균주를 활성화시켜서 사용하였다. 당 이용 검색 배지로는 변형된 PYF당 검색용 배지를 사용하였는데 그 조성은 yeast extract 10g, proteose peptone No. 3 5g, tryptone 5g, L-cysteine·HCl·H₂O 0.5g, salt solution 40 ml(CaCl₂ 0.2g, NaHCO₃ 10g, MgSO₄ 0.2g, NaCl 2g, K₂HPO₄ 1g, D.W. 1000 ml), D.W. 960 ml (pH 7.5)이다. 총 균수는 EG 한천배지와 BS *Bifidobacterium* 선택용 배지(Table 1)를 사용하여 혼합배양할 때의 각 균주를 선별하였다. Panose는 Sigma사 제품을 사용하였고 panose가 약 20% 함유된 분지올리고당(composition ; glucose 18.0%, maltose 28.0

Table 1. Composition of BS *Bifidobacterium* selective agar medium

Component	Amount (g/l)		
Lab-lemco powder (Oxoid)	2.4		
Proteose peptone No. 3	10.0		
Tryptone	5.0		
Bacto-soytone	3.0		
Yeast extract	5.0		
Liver extract	150 ml		
Glucose	10.0		
Soluble starch	0.5		
Tween 80	1.0		
L-Cysteine·HCl·H ₂ O	0.5		
Sodium propionate	15.0		
Agar	15.0		
*Solution A	10 ml		
**Solution B	5 ml		
***BS adding solution	10 ml		
D.W.	1000 ml		
pH 7.2			
*Solution A			
KH ₂ PO ₄	25g	**Solution B	
K ₂ HPO ₄	25g	MgSO ₄ ·7H ₂ O	10g
D.W.	250 ml	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
		NaCl	0.5g
		MnSO ₄	0.337g
		D.W.	250 ml
***BS adding solution			
Paromomycin sulfate (Sigma)	100 mg		
Neomycin sulfate (Sigma)	400 mg		
LiCl	6g		
D.W.	100 ml		

%, panose 24.0%, branched tetrose 29.5%, others 0.5%)은 *Bacillus licheniformis* amylase(BLA) 효소를 사용하여 김 등(11)의 방법으로 조제하여 사용하였다. 배지원은 Difco사 제품을 사용하였으며 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

실험방법

분지 올리고당 혼합물의 제조 : Malate-NaOH(50 mM, pH 7.0) buffer에 30% 쌀가루 현탁액을 만든 뒤 2%(v/v)의 액화효소(Termamyl, Novo)를 첨가하고 끓는 물에서 10분간 중탕 가열하여 액화시킨 후 autoclave에서 불활성시켰다. 여기에 5 mM의 EDTA를 첨가하고 BLA 효소로 50°C에서 12~15시간 반응시켜 분지 올리고당액을 만들고 1%(w/v) 활성탄과

이온교환수지를 사용하여 정제한 용액을 감압 증류하고 냉동 건조하여 백색의 분지 올리고당 혼합물을 제조하였다. 제조한 분지 올리고당 혼합물의 성분을 HPLC로 분석한 결과 glucose, maltose, panose, branched tetrose, branched pentose가 각각 16.7, 25.9, 22.6, 27.3, 7.5%였다.

배양방법 및 분석법 : 혐기성 세균 배양 용기의 headspace는 구리에 의해 산소가 제거된 CO₂ 가스로 치환한 후 사용하였다. 100 ml serum bottle의 PYF 50 ml(panose 혹은 분지 올리고당 0.5 w/v% 함유)에 종균을 5%되게 접종하고 37°C에서 배양하면서 일정 시간별로 일회용 주사기로 sampling하여 spectrophotometer로 600 nm에서 흡광도를 측정하여 생육곡선을 얻었다. *B. adolescentis*-*C. perfringens*, *B. adolescentis*-*C. paraputrificum*, *B. adolescentis*-*Bac. fragilis*의 혼합배양의 경우 종배양을 O.D.₆₀₀에서 0.5로 조정하여 접종하였고 배양중 일정량씩 취하여 희석액(KH₂PO₄ 4.5g, Na₂HPO₄ 6.0g, L-cysteine·HCl·H₂O 0.5g, Tween 80 0.5g, agar 1.0g, D.W. 1000 ml)에서 적당한 배율로 희석하여 EG 한천배지와 BS 선택배지에서 배양하여 생균수를 측정하였다. 혐기적 상태의 배양을 위하여 vacuum desiccator를 이용한 steel wool법(12)

과 anaerobic jar(Oxoid)를 사용하였다. 그리고 배양액 중의 panose 함량은 HPLC를 사용하여 분석하였으며 acetonitrile : water(65 : 35 v/v%)의 용매, RI detector(Pye-Unicam) 및 NH₂-column(Merck)을 사용하였다.

결과 및 고찰

Panose에 의한 생육효과

당 검색용 배지인 PYF에 0.5%(w/v) panose, 포도당, 분지 올리고당 혼합물의 첨가구와 당원이 첨가되지 않은 PYF 배지에 각각의 균을 접종하여 37°C에서 2일간 단독배양하면서 생육곡선을 작성하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 *Bifidobacterium*, *L. acidophilus*, *C. butyricum*을 제외한 사용균주 대부분은 panose를 이용하여 생육하지 못했으나 분지 올리고당 혼합당의 배양액에서는 잘 생육함을 알 수 있었다. 이는 분지 올리고당 혼합당에 함유된 glucose, maltose 등의 효율 좋은 당원을 사용하여 생육하는 것으로 생각된다. Fig. 1의 분지 올리고당 혼합물에 의한 *B. adolescentis*의 생육곡선을 보면 하루 배양된 후 당원이 포도당인 대조구보다 생육의 정도가 약 절반

Table 2. Growth of selected species of intestinal bacteria on the PYF of panose (0.5%) and branched oligosaccharides (0.5%)

Microorganism	Glucose	Panose	Branched oligo-saccharides*
<i>B. adolescentis</i> KTCC3216	++**	+	+
<i>B. longum</i> IV-51	++	+	+
<i>L. acidophilus</i> KCTC3151	++	++	++
<i>Bac. fragilis</i> ATCC 25285	++	-	++
<i>E. limosum</i> ATCC 8481	++	-	++
<i>C. perfringens</i> ATCC 13214	++	-	+
<i>C. paraputrificum</i> ATCC 25780	++	-	***
<i>C. butyricum</i> ATCC 19398	++	++	++
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	++	.	++
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	++	-	+
<i>E. coli</i> ATCC 11775	++	-	++

*Composition of branched oligosaccharides: glucose 18.0%, maltose 28.0%, panose 24.0%, branched tetraose 29.5%, others 0.5%

$$**DG = \frac{OD \text{ for tested sugar} - OD \text{ without the sugar}}{OD \text{ for glucose} - OD \text{ without the sugar}} \times 100$$

++ = DG ≥ 75, + = 50 ≤ DG < 75, . = 25 ≤ DG < 50, - = DG < 25, DG: degree of growth, OD: optical density at 600 nm (Maximum values of optical density during 2 day-cultivation were taken as OD)

***not tested

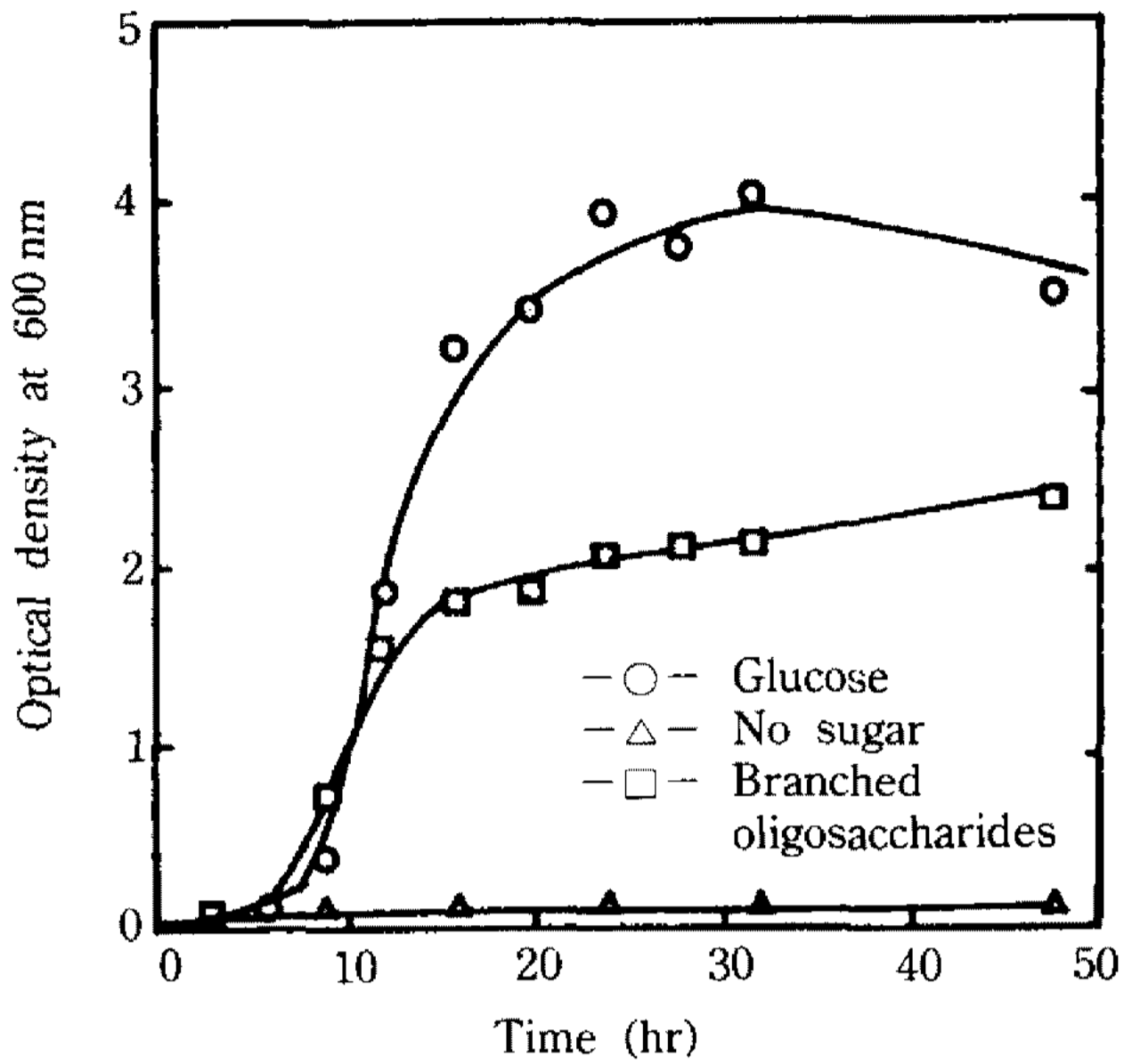


Fig. 1. Growth curve of *Bifidobacterium adolescentis* on the modified PYF medium containing branched oligosaccharides or glucose as a carbon source.

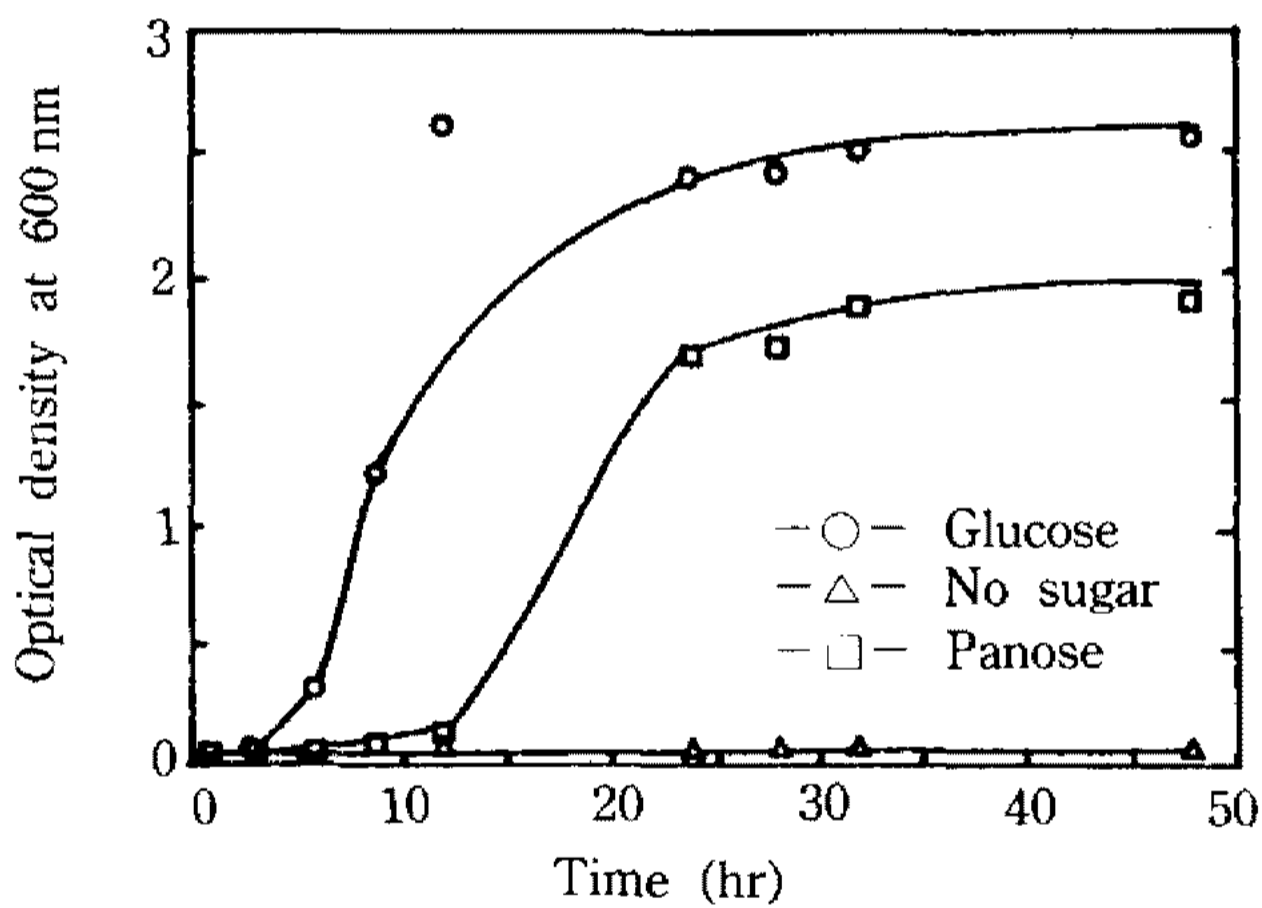


Fig. 2. Growth curve of *Bifidobacterium adolescentis* on the modified PYF medium containing panose or glucose as a carbon source.

정도에 지나지 않고 있는데 이는 우선 분지 올리고당 혼합물에 약 40% 함유된 glucose, maltose 등을 먼저 이용하는 것으로 생각된다. Fig. 2에서 보는 바와 같은 *B. adolescentis*와 *B. longum*은 panose를 당원으로 사용한 경우 포도당구보다 lag phase가 길기는 하였지만 panose를 이용하여 생육하고 있음을 알 수 있었고, *L. acidophilus*도 이 PYF 배지에서 생육은 잘 되지 않았지만 panose를 이용하고 있음을 알 수 있었다.

한편 *Clostridium*속 세균들의 생육에 미치는 영향을 보면 *C. butyricum*은 당원에 관계없이 잘 생육했으나 병원성균으로 알려진 *C. paraputrificum*은 panose를

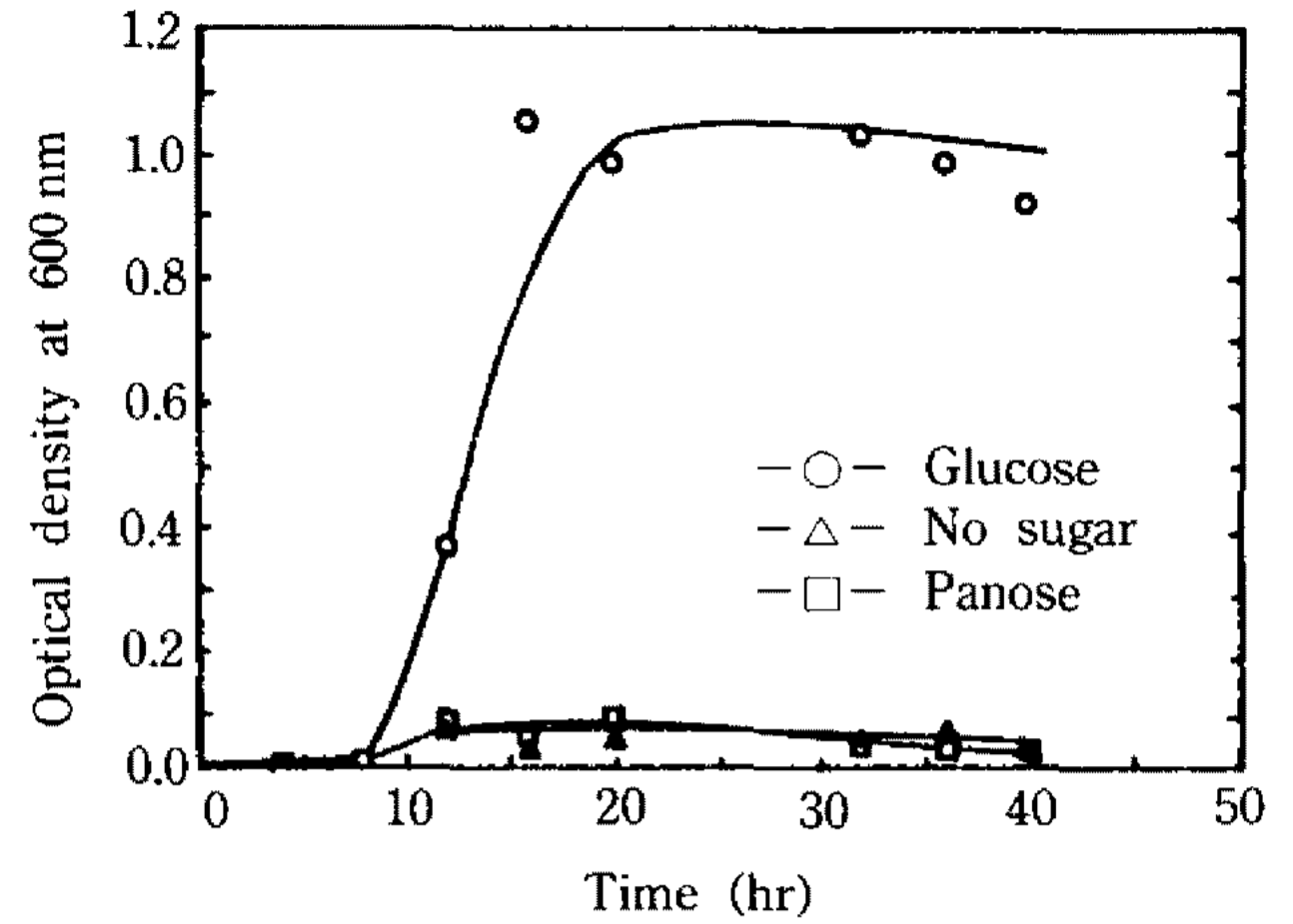


Fig. 3. Growth curve of *Clostridium paraputrificum* ATCC 25780 on the modified PYF medium containing panose or glucose as a carbon source.

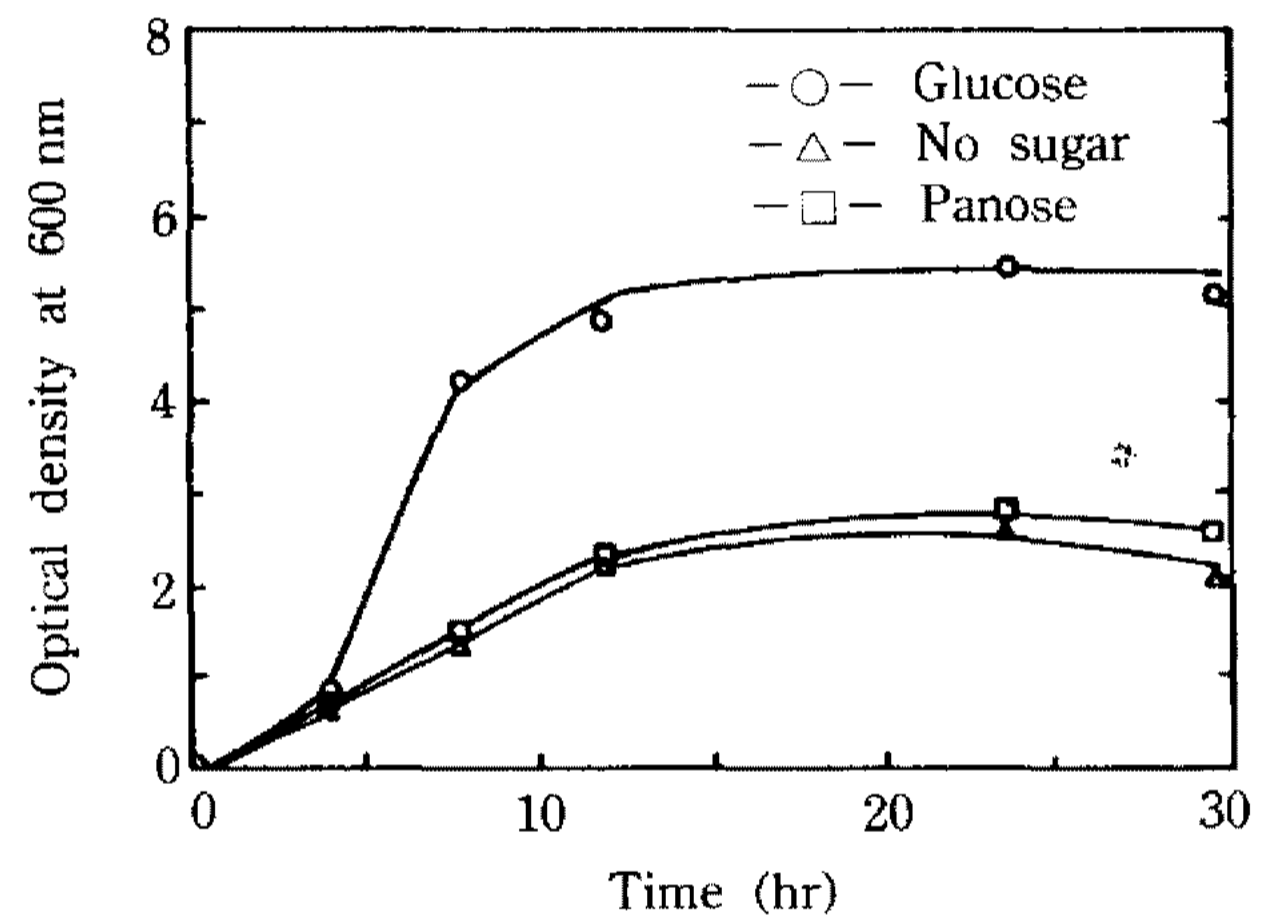


Fig. 4. Growth curve of *Clostridium perfringens* on the modified PYF medium containing panose or glucose as a carbon source.

전혀 이용하지 못하였다(Fig. 3). *C. perfringens*의 경우(Fig. 4)도 어느 정도 생육은 이루어지고 있으나 당원이 첨가되지 않은 대조구와 비슷한 생육을 보이고 있는 것으로 보아 panose를 이용하지 못하는 것으로 보인다.

또한 장내 최다 균주의 하나인 *Bac. fragilis*, 자발성 감염(autogenous infection)을 유발시키는 *S. aureus*와 *E. coli*도 이용하지 못하는 것으로 나타났다. 이와같은 결과를 볼 때 panose는 인체 유익균으로 알려진 *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*에 의해 이용되고, *C. perfringens* 등의 장내 일부 유해균들은 이용하지 못하고 있는 것을 알 수 있었다.

분지 올리고당 혼합물에 의한 생육효과

장내에서는 많은 세균들이 서로 영양원에 대한 경쟁

Table 3. Viable number of *B. adolescentis* by mixed culture with *B. fragilis*, *C. paraputrificum* and *C. perfringens* on EG and BS selective medium (/ml)

Culture type	Culture time (hr)		
	0	24	48
<i>B. adolescentis</i> only	1.9×10^7	1.9×10^9	1.5×10^{11}
<i>B. adolescentis</i> - <i>Bac. fragilis</i>	1.9×10^7	6.3×10^8	1.1×10^{10}
<i>B. adolescentis</i> - <i>C. paraputrificum</i>	1.9×10^7	9.6×10^8	3.4×10^{10}
<i>B. adolescentis</i> - <i>C. perfringens</i>	1.9×10^7	6.5×10^7	1.0×10^{10}

Culture medium: PYF of branched oligosaccharides (0.5%)

(13)이 치열하게 이루어지고 있으며 따라서 혼합배양을 통해서 *B. adolescentis*에 의한 분지 올리고당 혼합물의 당 이용성을 알아보려고 분지올리고당(24% panose, 30% branched tetraose, 18% glucose, 28% maltose)을 당원으로 사용하여 *B. adolescentis*와 *C. perfringens*, *C. paraputrificum*, *Bac. fragilis*를 각각 혼합 배양하였다.

Table 3은 *B. adolescentis*와 *Bac. fragilis*, *C. paraputrificum*, *C. perfringens*의 혼합배양시 각 시간별의 *B. adolescentis*의 생균수를 측정된 결과이다. *B. adolescentis*와 stationary phase에 이르는 시간이 약 24시간으로 비슷한 *C. paraputrificum*와 *Bac. fragilis*의 24시간 혼합배양의 균수가 9.6×10^8 , 6.3×10^8 인 혼합배양의 경우는 *B. adolescentis*의 단독배양 때의 균수 1.9×10^9 와 비교해 볼 때 각 균들 사이에 포도당 등의 효율 좋은 영양원에 대한 경쟁이 비슷한 수준인 것으로 보여진다. 그러나 stationary phase에 이르는 시간이 12시간으로 생육이 빠른 *C. perfringens*와의 혼합배양의 경우는 24시간 배양 후 생균수가 6.5×10^7 으로 타 혼합 배양보다 적으며 아직도 lag phase 생육 상태임을 알 수 있었다. 이는 *B. adolescentis*가 배양 24시간까지 거의 자라지 못한 것으로 추정되며 따라서 효율 좋은 영양원에 대한 경쟁은 불리한 것으로 보인다. 그러나 배양액에 panose 등의 *C. perfringens*가 이용하지 못하는 당원만 남아 있을 때 *B. adolescentis*는 이를 이용하여 생육하고 있음을 알 수 있었다 (Fig. 5와 Table 3). 또한 Fig. 5에서 *B. adolescentis*는 단독 배양했을 때보다 *C. perfringens*와 혼합배양하였을 때 panose를 더 잘 이용하고 있는 것으로 나타났다. 그런데 伊藤等(14)은 장내에는 수많은 세균이 존재하므로 모든 균이 충분히 이용할 수 있는 영양

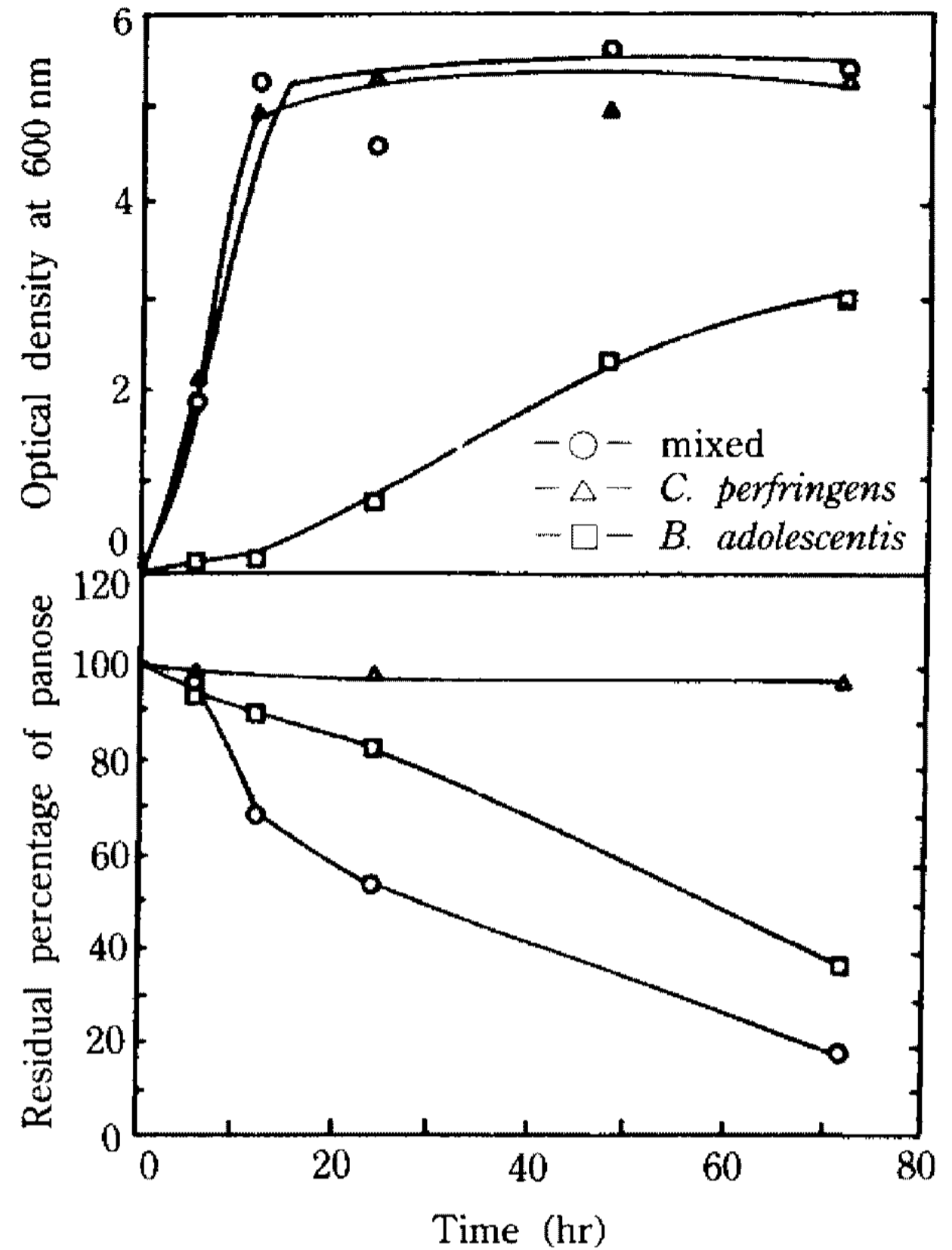


Fig. 5. Consumption pattern of panose in branched oligosaccharides during single and mixed cultures of *Bifidobacterium adolescentis* and *Clostridium perfringens* on the modified PYF medium.

소는 없기 때문에 세균 상호간에 균형이 이루어지고 있다고 제안하였다. 따라서 *C. perfringens*가 배양액 중의 glucose, maltose 등의 효율 좋은 탄소원을 먼저 이용하고는 있으나, 장내에서는 여러 균들간에 효율 좋은 영양원에 대한 섭취 경쟁으로 영양원의 부족한 현상이 일어나므로 panose는 *Bifidobacterium*을 선택적으로 증식시켜 장내 균총을 개선할 수 있으리라 생각된다. 그러나 Kohmoto 등(15)의 연구에 의하면 panose, isomaltose 및 isomaltotriose 등이 함유된 isomalto-oligosaccharide를 인체에 투여한 *Bifidobacterium* 증식의 minimum dosage가 fructooligosaccharide보다 많은 것으로 나타났는데 이는 소장 of isomaltase 등에 의한 소화성에 기인하는 것으로 생각된다. 본 panose와 올리고당 혼합물도 인체 소화관에서 소화성 및 흡수에 대한 검토와 아울러 인체 실험을 통하여 장내 세균의 균총의 변화를 밝히는 것이 필요하다고 본다.

요 약

Panose와 분지 올리고당 혼합당을 탄소원으로한

PYF당 검색용 배지에서 장내 주요 세균인 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*의 생육을 조사하였다. *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *L. acidophilus* 등은 panose 배지에서 lag phase가 긴 편이었으나 생육이 양호함을 알았고 *C. perfringens*, *C. paraputrificum*, *Bac. fragilis*, *S. aureus* 등은 자라지 못했다. Panose 등을 함유하는 분지 올리고당 혼합당을 탄소원으로 하여 *B. adolescentis*와 *C. perfringens*를 혼합배양하면 *C. perfringens*가 더 이상 자라지 못하는 상태에서도 *B. adolescentis*는 panose를 이용하여 생육하고 있음을 알았다. 배양 후 배양액 중의 성분을 분석해 본 결과 *B. adolescentis*의 배양액에는 panose 함량이 현저히 감소하였으나 *C. perfringens* 배양액에서는 panose 함량이 감소하지 않았다. 따라서 *B. adolescentis*는 분지 올리고당 혼합당을 선택적으로 이용할 수 있음을 알았다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처 특정과제 연구비와 농업생물 신소재 연구센터의 지원으로 수행하였으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 辨野義己. 1990. 食餌とヒト腸内フローラの構成. *ビフィズス*. 4: 1-12.
2. Modler, H.W., R.C. McKeller, and M. Yaguchi. 1990. Bifidobacteria and bifidogenic factors. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 23: 29-41.
3. McDonel, J.L. 1980. *Clostridium perfringens* toxins (Type A, B, C, D, E). *Pharmac. Ther.* 10: 617-655.
4. 菅原典子. 1990. 腸内細菌學(光岡知足), p.193. 朝倉書店, 東京.
5. 光岡知足. 1990. 腸内細菌學(光岡知足), p.88. 朝倉書店, 東京.
6. 和田光一, 水谷潤, 渡部侑子, 鈴木宏美, 白柳賞. 1991. 大豆 オイゴ 糖の各 攝取量によるト腸内フローラに及ぼす影響. *ビフィズス*. 5: 51-54.
7. Saha, S.S., P.M. Bramley, and I.S. Menzies. 1982. The fermentation of lactulose by colonic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 128: 319-325.
8. Benno, Y., K. Endo, N. Shiragami, K. Sayama, and T. Mitsuoka. 1987. Effect of fannose on human fecal microflora. *Bifidobacteria Microflora* 6: 59-63.
9. Hidaka, H., T. Eida, T. Takizawa, T. Tokunaga, and Y. Tashiro. 1986. Effect of fructooligosaccharide on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora* 5: 37-50.
10. 大塚耕太郎, 辨野義己, 遠藤希三子, 上田弘, 小澤修, 内田隆次, 光岡知足. 1989. 4'-ガラクトシルラクト-スのヒトの腸内フローラに及ぼす影響. *ビフィズス* 2: 143-149.
11. Kim, I.C. 1991. Molecular cloning of thermostable α -amylase and maltogenic amylase from *Bacillus licheniformis* and characterization of their enzymatic properties. Ph.D. Thesis. Seoul National University.
12. 光岡知足. 1984. 腸内菌の世界. 叢文社, 東京.
13. Feter, R., H. Brickner, M. Botney, D. Cleven, and A. Aranki. 1983. Mechanisms which control bacterial population in continuous flow culture models of mouse large intestinal flora. *Infec. Immun.* 39: 676-685.
14. 伊藤喜久治. 1990. 腸内細菌學(光岡知足), p.127. 朝倉書店, 東京.
15. Kohomoto, T., F. Fukui, H. Takaku, and T. Mitsuoka. 1991. Dose-response test of isomalto-oligosaccharides for increasing fecal bifidobacteria. *Agric. Biol. Chem.* 55: 2157-2159.

(Received February 14, 1992)